

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงพรรณนา ณ จุดใดจุดหนึ่ง (Cross Sectional Descriptive Design)

ระเบียบวิธีการวิจัย

1) ประชากรที่ศึกษา

Inclusion criteria ผู้ป่วยเด็ก 0 – 15 ปีที่เข้ารับการรักษาตัวในแผนกผู้ป่วยใน ตึกสิริกิติ์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่มีอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำระหว่างเดือน พฤศจิกายน พ.ศ.2545 – เดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2546

Exclusion criteria

- 1) ผู้ป่วยที่มีอาการถ่ายเหลวเรื้อรังเกิน 7 วัน
- 2) ผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น การติดเชื้อไวรัสเอดส์ โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว

2) การคำนวณขนาดตัวอย่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่างคำนวณโดยอ้างอิงจากงานวิจัยที่มีการทบทวนวรรณกรรมของ Noppornpanth S. และคณะ⁽¹⁴⁾ ได้ทำการศึกษาระบาดของเชื้อโรตาไวรัสในเด็กที่มีอาการท้องร่วงเฉียบพลันในเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปี ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2541 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ.2542 พบเชื้อโรตาไวรัสในอุจจาระโดยวิธี RT-PCR 42 ใน 83 อุจจาระที่ส่งตรวจ (50.6%) ยอมรับให้ความคลาดเคลื่อนได้ไม่เกิน 10% กำหนดระดับความเชื่อมั่นในการสรุปข้อมูล = 95%

$$N = Z_{\alpha/2}^2 PQ/d^2$$

$$N = (1.96)^2 (0.506) (0.494)/(0.1)^2$$

$$N = 96 \text{ คน}$$

3) วัตถุประสงค์และวิธีการ

3.1) การเก็บอุจจาระ

อุจจาระจะถูกเก็บจากผู้ป่วยโดยใช้ถุงพลาสติกใสสำหรับเก็บปัสสาวะในเด็ก แปะที่บริเวณรอบรูทวารหนักเพื่อให้ได้อุจจาระทั้งในส่วนที่เป็นน้ำและเนื้อ

บรรจุในภาชนะที่มีฝาปิด อยู่ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จัดส่งห้องปฏิบัติการ
ไวรัสที่ตึกสิริกิติ์ชั้น 9 ภายใน 1 วัน

3.2) การเก็บ clinical specimen

นำอุจจาระที่เก็บได้มาผสมกับ Phosphate Buffered Saline ใน
อัตราส่วน 1:3 นำมา centrifuge 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเอา
supernatant เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 70 องศาเซลเซียส

3.3) การสกัด RNA

RNA ถูกสกัดจาก supernatant ของ stool 100 μ L โดยวิธี
guanidinium isothiocyanate ตามที่บรรยายไว้ใน Theamboonlers A, et al.
2002⁽¹⁸⁾

3.4) การตรวจจนวนออร์โรวีรัส

ใช้วิธี RT-PCR โดยนำ RNA ที่สกัดได้มา reverse transcribed เป็น
cDNA โดยใช้ primer Y2 (5' TCA GAM AGK GCA CAS AGA GT-3')
cDNA ที่ได้จะนำมาเพิ่มจำนวนโดย nested PCR โดยใช้ primer Y1(5' TGG
GAC TCA ACA CAR CAG AG-3') เป็น sense primer และ primer Y2 เป็น
antisense primer ในแต่ละตัวอย่างประกอบด้วย 25 μ L ของ reaction buffer
(10 μ M dNTP, 0.2 μ L Tag polymerase 0.5 μ L primer และ 3.0 μ L ของ
DNA template) โดยขบวนการขยายจำนวนทำในเครื่อง thermocycler ที่
94 $^{\circ}$ C 5 นาทีและอีก 30 รอบของ 94 $^{\circ}$ C 1 นาที, 55 $^{\circ}$ C 1 วินาที, 72 $^{\circ}$ C 1วินาที
และอีก 1 รอบของ 72 $^{\circ}$ C 10 นาที หลังจากนั้น electrophoresis ใน 2% agarose
gel ย้อมด้วย ethidium bromide ถ้าเป็นเชื้อออร์โรวีรัสจะเห็นแถบ 233 bp
ภายใต้แสง UV โดยใช้ UV trans-illuminator

3.5) การตรวจโรคหาวีรัส

ใช้วิธี RT-PCR โดยใช้ primer A(5'CCG TCT GGC TAA CGG TAA GCT 3')
และ primer B(5'GGT CAC ATC GAA CAA TTC TAA 3') ถ้าเป็นเชื้อโรคหาวีรัส
จะเห็นแถบ 1062 bp ภายใต้แสง UV โดยใช้ UV trans-illuminator

3.6) การทำ DNA sequencing และ BLAST

นำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ gel extraction kit
(QIAquick, Germany) และใช้ sense primer (Y1) และ antisense primer (Y2)
สำหรับออร์โรวีรัสและ primer A และ B สำหรับโรคหาวีรัสเพื่อทำ DNA
sequencing โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (Genetic Analyzer 310, Perkin Elmer, USA)

นำ sequence ของแต่ละตัวอย่างมาทำการ BLAST เพื่อยืนยันผลของ PCR ที่ได้ว่าเป็น virus ที่ต้องการหาจริงโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปของ NCBI โดยเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ทั่วโลกใน Genbank (ดังรูปที่ 3 และรูปที่ 4)

การรวบรวมข้อมูล

1) ข้อมูลผู้ป่วย

1.1) ข้อมูลทั่วไป เพศ อายุ เดือนที่ป่วยด้วยโรคอุจจาระร่วงโดยรวบรวมข้อมูลจากแฟ้มประวัติผู้ป่วย

1.2) ข้อมูลทางคลินิก ใช้ อาการอาเจียน อาการปวดท้อง อาการท้องร่วงทั้งลักษณะและจำนวน อาการการติดเชื้อทางระบบทางเดินหายใจส่วนบน อาการแสดงของการขาดน้ำ โรคประจำตัว ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นด้วย โดยรวบรวมข้อมูลจากแฟ้มประวัติผู้ป่วยและการซักประวัติด้วยตนเองโดยผู้วิจัย

1.3) ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ ข้อมูลเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว เกร็ดเลือด อิเล็กโทรไลต์ ผลการตรวจอุจจาระโดยกล้องจุลทรรศน์ ผลการเพาะเชื้อแบคทีเรียในอุจจาระโดยรวบรวมข้อมูลจากแฟ้มประวัติผู้ป่วย

2) ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการทางไวรัส ผลการตรวจ Rotavirus PCR และ Norwalk virus PCR

การวิเคราะห์ข้อมูล

1) การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางระบาดวิทยาโดยใช้ค่าเฉลี่ย(mean) เปอร์เซ็นต์(percentage) สัดส่วน(ratio)

2) การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงวิเคราะห์ (analytic statistics) ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างโรตาไวรัสและนอร์วอล์คไวรัส โดยใช้ Mann-Whitney test สำหรับ continuous data และใช้ Chi-square test หรือ Fisher's exact test สำหรับ discontinuous data ขึ้นกับจำนวนตัวอย่าง การวิเคราะห์ที่ใช้โปรแกรม SPSS 9.0 โดยค่า $p < 0.05$ มีนัยสำคัญทางสถิติ

ปัญหาทางจริยธรรม

โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นที่เรียบร้อยแล้วทั้งระเบียบการศึกษาวิจัยและเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในงานวิจัย การวิจัยนี้เป็นการศึกษาด้านระบาดวิทยาโดยใช้สิ่งส่งตรวจคืออุจจาระ จึงไม่มีอันตรายใดๆต่อผู้ป่วย รวมทั้งได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากตัวอย่างที่นำมาศึกษา โดยผู้วิจัยได้ให้ข้อมูลอย่างละเอียดและชัดเจนเพียงพอก่อนการเซ็นใบยินยอม